

· 实验研究 ·

氧诱导视网膜病变鼠模型血管内皮生长因子 mRNA 的表达

韩梅 孔怡淳 赵堪兴 袁松涛 李宁东

【摘要】 目的 分析氧诱导视网膜病变动物模型血管内皮生长因子(VEGF)基因的调节规律,阐明早产儿视网膜病变(ROP)新生血管形成的可能机制。方法 将 36 只 7 d 龄 C₅₇BL/6J 幼鼠暴露在(75±2)%浓度的高氧状态下 5 d,随后在正常氧环境下 5 d,作为氧诱导模型组;另 24 只同日龄幼鼠作为正常对照组。采用荧光素血管灌注及视网膜铺片法观察视网膜血管形态;半定量逆转录-聚合酶链反应(RP-PCR)观察各组 VEGF mRNA 的变化。结果 氧诱导模型的视网膜血管形态特征为高氧状态下表层和深层血管的中心区出现无灌注,相对低氧状态下 2 d 后开始出现新生血管,其部位在中周部。RF-PCR 结果显示,VEGF 的表达与眼内新生血管的发生存在明确的时空对应关系,即高氧状态下,VEGF mRNA 转录下降,相对低氧状态下,VEGF mRNA 过度转录。结论 缺氧是视网膜新生血管发生的主要原因;高氧之后的相对低氧使 VEGF 表达增加,可能会降低 ROP 新生血管的发生。

【关键词】 视网膜病,早产儿; 内皮生长因子; 基因表达; 视网膜新生血管化; 疾病模型,动物
中图分类号:R772 R774.1 R446

Expression of mRNA of vascular endothelial growth factor in mouse with oxygen-induced retinopathy
HAN Mei, KONG Yi-chun, ZHAO Kan-xing, et al. Tianjin Eye Hospital, Tianjin Eye Institute, Tianjin 300020, China

Corresponding author: ZHAO Kan-xing, Email: zkx@tjmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the regulative rule of mRNA of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mice with oxygen-induced retinopathy, and to elucidate the possible mechanism of occurrence of neovascularization in retinopathy of prematurity (ROP). **Methods** Sixty 7-day-old C57BL/6J mice were divided into oxygen-induced retinopathy group and control group. In oxygen-induced retinopathy group, 36 mice were exposed to 75% oxygen for 5 days and then to room air for 5 days; in control group, 24 mice were raised in room air. Vascular perfusion of fluorescein and retinal stretched preparation were used to observe the morphologic changes of retinal vessels. Reversal transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to observe changes of VEGF mRNA in each group. **Results**

In oxygen-induced retinopathy group, the morphologic characteristics of retinal vessels were the unperfused area at the center of superficial and deep-seated vessels, and the neovascularization appeared at mid-peripheral retina after 2 days in relative hypoxia condition. The results of RT-PCR showed space-time corresponding relation between expression of VEGF and neovascularization, which meant that the transcription of VEGF mRNA decreased in hyperoxia condition and increased in relative hypoxia condition. **Conclusion** Hypoxia is the main reason of occurrence of retinal neovascularization; increased expression of VEGF caused by relative hypoxia after hyperoxia might be effective in reducing the occurrence of neovascularization in ROP.

【Key words】 Retinopathy of prematurity; Vascular endothelial growth factor; Gene expression; Neovascularization; Disease models, animal

氧诱导视网膜病变鼠模型是早产儿视网膜病变(ROP)和其他异常视网膜血管增生性疾病的主要模型之一。ROP 的重要特征是视网膜新生血管的形成,在视网膜发育过程中,血管内皮生长因子(VEGF)对视网膜血管的发生具有重要的调节作用。我们通过氧诱导视网膜病变鼠模型的建立,采用荧光素血管灌注

及视网膜铺片法、半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)研究 VEGF mRNA 的表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

采用 C₅₇BL/6J 幼鼠。孕鼠由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,饲养于天津医科大学公共卫生学院动物房,待生产后新生幼鼠与哺乳母鼠

共同饲养,每组幼鼠至少有 2 只哺乳母鼠。新生幼鼠雌雄兼有,共 60 只,全部为清洁动物。内对照 β -肌动蛋白(β -actin)的上游引物为 5'-TCTACAATGAGCTG-CGTGTGG-3',下游引物为 5'-GGAACCGCTCAT-TGCCAATG-3',扩增产物片段为 450 碱基对(bp)。VEGF 的上游引物为 5'-CAGAAACACGACAAA-CCCATCC-3',下游引物为 5'-TAAGCCACTCACACACAGCC-3',扩增产物片段为 460bp,均由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 动物模型制备与分组

氧诱导模型组:幼鼠出生时作为出生后第 0 天。出生后第 7 天的幼鼠(36 只)与哺乳母鼠一起放入自制的密闭玻璃容器内,一端设计为进气孔,另一端设计为出气孔,先将玻璃容器内变为真空状态,然后接入 100%湿润医用纯氧气,氧气流量控制在 1.5 L/min,使容器内氧分压为(75±2)%,期间用氧浓度测氧仪监测容器内的氧分压,控制室温在(23±2)℃,日光照明,每 2 天打开玻璃容器更换垫料、加食、换水、替换母鼠。在此高氧环境下饲养 5 d(即出生后第 12 天),然后返回正常空气环境中饲养 5 d(即出生后第 17 天),使幼鼠处于相对低氧状态下。实验组再分为 3 个小组,分别在出生后第 12、14、17 天处死幼鼠。

正常对照组:采用同日龄(即出生后第 7 天)的幼鼠(24 只)置于(23±2)℃的空气环境下饲养。对照组再分为 2 个小组,分别在出生后第 12、17 天处死幼鼠。

每组实验重复 3 次,以获得足够视网膜组织进行 PCR 分析。幼鼠分别于出生后第 7、12、17 天测量尾长度及体重。

1.3 荧光素血管灌注及视网膜铺片法

首先固定幼鼠,用氯胺酮按 2.5 ml/kg 的剂量麻醉后,将胸骨剖开,充分暴露心脏,将相对分子质量为 2×10^6 的异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)(FD-2000S,美国 Sigma 公司)50 mg 溶解在 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中。从左心室进针,推注 FITC-Dextran。注射过量的氯胺酮处死幼鼠,摘取眼球,放在 4%多聚甲醛液中,4℃固定 3 h。在手术显微镜下,去除角膜、晶状体、巩膜、脉络膜、视网膜色素上皮层(RPE),将视网膜分为 4 瓣,平铺于载玻片上,用中性树脂胶封片,盖上盖玻片。在荧光显微镜下观察,数码相机拍片。荧光标本在低温避光环境下保存。

1.4 组织总 RNA 的提取及鉴定

按 0.2 mg/ml 的剂量腹腔内注射戊巴比妥钠处死幼鼠。在手术显微镜下摘取眼球,去除角膜、晶状体、玻璃体,取出视网膜组织(每组 RNA 提取需 4 只眼的

视网膜组织),放入 1 ml Trizol 液(美国 Invitrogen 公司)中,所有样本放在 -80℃保存。采用 Trizol 一步法提取组织总 RNA。每组各取 1 μ l 样品,用紫外分光光度计测定总 RNA 在波长为 260、280 nm 时的吸光度[A,旧称光密度(OD)]值。另取 1 μ l 用 1%琼脂糖电泳观察 RNA 有无明显降解,其余放在 -80℃冰箱中保存备用。

1.5 RT-PCR

采用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 试剂盒(由宝生物工程有限公司提供)进行 RT-PCR 反应。逆转录反应体系含: $MgCl_2$ 4 μ l, 10 倍 RT buffer 2 μ l, 去 RNA 酶水 dH_2O 7.5 μ l, 脱氧核糖核苷酸混合物 2 μ l, RNA 酶抑制剂 0.5 μ l, AMV RT 1 μ l, 寡核苷酸结合引物 1 μ l, 组织总 RNA 2 μ l, 共 20 μ l。反应条件为: 50℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。PCR 反应体系: cDNA 产物 5 μ l, 5 倍 PCR buffer 5 μ l, rTaq 酶 0.125 μ l, 上、下游引物各 2 μ l, 灭菌蒸馏水 10.875 μ l 共 25 μ l。反应条件为: 94℃ 2 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 35 个循环,其中 VEGF 退火温度为 59℃, β -actin 退火温度为 59℃。

1.6 PCR 产物的检测

取各组的 PCR 产物 5 μ l, 在含有 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像系统进行灰度扫描,记录 VEGF 及相应 β -actin 的 A 值,进行半定量分析。

1.7 统计学处理

采用非配对 *t* 检验方法比较氧诱导模型组与正常对照组的 VEGF mRNA 的转录水平,所有数据经 SPSS10.0 软件进行统计学处理与分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 实验全过程中幼鼠的整体变化

出生后第 7 天幼鼠体重 2.78 g, 尾长 2.16 cm。出生后第 12 天: 正常对照组幼鼠体重 4.5 g, 尾长 3 cm; 氧诱导模型组幼鼠体重 3.63 g, 尾长 2.73 cm。出生后第 17 天: 正常对照组体重 7 g, 尾长 5 cm; 氧诱导模型组体重 6.5 g, 尾长 4.3 cm。在所有阶段氧诱导模型组幼鼠均比正常对照组体重低、尾短。

2.2 视网膜血管形态

正常对照组: 幼鼠出生后第 12 天时内层毛细血管丛覆盖在大部分视网膜上,仅在周边部有小片状无血管区,表层血管呈放射状(图 1); 出生后第 17 天时无血管区消失,全部视网膜被成熟的毛细血管网覆盖,既

有表层血管又有深层血管,表层血管形态呈完好的放射状分支结构,深层血管呈多边形的网状结构(图 2)。

氧诱导模型组:幼鼠出生后第 12 天时视网膜血管化推迟,视网膜血管普遍收缩、闭塞,中心区及视网膜 4 个分叶的中周部出现大片无灌注区;周边部视网膜深层有小片状的毛细血管网发育,无灌注区与有血管区交界处可见血管代偿性扩张(图 3)。出生后第 14 天时视网膜无灌注区略有缩小,表层放射状血管纤细扩张,开始出现新生血管(图 4)。出生后第 17 天时点状、球形的微血管瘤样扩张,无灌注区明显缩小,仅见于 2 个分叶,在中周部出现较多的新生血管(新生血管表现为丛状、片状、簇状),有荧光素渗漏(图 5)。

2.3 VEGF mRNA 在视网膜组织中的表达

总 RNA 的提取及 β -Actin 的表达:1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 无明显降解,总 RNA 在波长 260、

280 nm 时 A 值的比值为 1.8~2.1。视网膜组织总 RNA 逆转录后扩增出的 β -actin 片断约为 450 bp。幼鼠出生后第 12 天时氧诱导模型组 VEGF mRNA 转录(比值为 0.40 ± 0.02)比正常对照组(比值为 0.65 ± 0.05)明显下降,正常对照组是氧诱导模型组的 1.6 倍,二者差异有统计学意义($t=8.041, P=0.001$)。出生后第 17 天时氧诱导模型组 VEGF mRNA 转录(比值为 0.91 ± 0.02)比正常对照组(比值为 0.55 ± 0.04)明显上升,是其 1.7 倍,差异有统计学意义($t=15.116, P=0.000$)。氧诱导模型组出生后第 14 天时 VEGF mRNA 转录(比值为 0.87 ± 0.07)比第 12 天时升高近 2.2 倍,二者比较差异有统计学意义($t=12.044, P=0.000$);第 17 天时 VEGF mRNA 转录比第 12 天时升高近 2.3 倍,二者比较差异有统计学意义($t=33.387, P=0.000$)(图 6)。

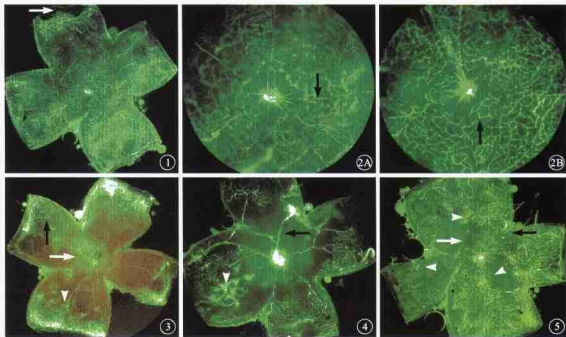


图 1 正常对照组出生后第 12 天视网膜铺片荧光显微镜像。深层毛细血管丛覆盖在大部分视网膜上,仅在周边部有小片状的无血管区(白箭)×40 **图 2** 正常对照组出生后第 17 天视网膜铺片荧光显微镜像。**2A**,表层血管形态呈完好的放射状分支结构(白箭)×40 **图 3** 氧诱导模型组出生后第 12 天视网膜铺片荧光显微镜像。中心区及视网膜 4 个分叶的中周部出现大片无灌注区(黑箭);周边部视网膜深层有小片状的毛细血管网发育(黑箭),无灌注区与有血管区交界处可见血管代偿性扩张(白箭头)×40 **图 4** 氧诱导模型组第 14 天视网膜铺片荧光显微镜像。视网膜无灌注区略有缩小(白箭),表层放射状血管过粗扩张(黑箭),开始出现新生血管(白箭头)×40 **图 5** 氧诱导模型组第 17 天视网膜铺片荧光显微镜像。点状、球形的微血管瘤(黑箭),无灌注区明显缩小,仅见于 2 个分叶(白箭),在中周部出现较多的新生血管(白箭头)×40

Fig. 1 Photograph of fluorescence microscope of stretched preparation of retina in a 12-day-old rat in the control group. Deep-seated capillary vessels are incubated on most of retina, and small patch of avascular area is at the peripheral retina (white arrow) ×40 **Fig. 2** Photograph of fluorescence microscope of stretched preparation of retina in a 17-day-old rat in the control group. **2A**, A fine radial branching pattern in the superficial retinal layer (white arrow) ×40 **2B**, A polygonal reticular pattern in the deep retinal layer (black arrow) ×40 **Fig. 3** Photograph of fluorescence microscope of stretched preparation of retina in a 12-day-old rat in oxygen-induced retinopathy group. Large patch of unperfused area at the center and mid-peripheral of four parts of retina (white arrow), small patch of capillary net in the deep layer of peripheral retina (black arrow), and compensatory dilated vessels at the junction between unperfused and vascular area (white arrowhead) ×40 **Fig. 4** Photograph of fluorescence microscope of stretched preparation of retina in a 14-day-old rat in oxygen-induced retinopathy group. Shranken retinal unperfused area (white arrow), tortuous and dilated radial vessels in the superficial retinal layer (black arrow), and neovascularization (white arrowhead) ×40 **Fig. 5** Photograph of fluorescence microscope of stretched preparation of retina in a 17-day old rat in oxygen-induced retinopathy group. Dot like and globul micro-aneurysms (black arrow), obviously shranken retinal unperfused area which only appears at 2 parts (white arrow), and many neovascularization at mid-peripheral retina (white arrowheads) ×40



图6 各幼稚鼠视网膜 VEGF mRNA 表达电泳图。1:Marker; 2:β-actin; 3:正常对照组出生后第 12 天; 4:氧诱导模型组出生后第 12 天; 5:氧诱导模型组出生后第 14 天; 6:氧诱导模型组出生后第 17 天; 7:正常对照组出生后第 17 天

Fig. 6 Photograph of electrophoretogram of VEGF mRNA of the mice retina in each group. 1:Marker; 2:β-actin; 3: 12-day-old rat's retina in control group; 4: 12-day-old rat's retina in oxygen-induced retinopathy group; 5: 14-day-old rat's retina in oxygen-induced retinopathy group; 6: 17-day-old rat's retina in control group; 7: 17-day-old rat's retina in oxygen-induced retinopathy group.

3 讨论

ROP 是一种增生性视网膜病变,是儿童主要致盲眼病之一,其致盲的原因很复杂,但与视网膜新生血管的发生、发展有着密切关系。

我们采用氧浓度测定仪在出气孔监测容器内的氧分压以使 7 d 龄幼鼠暴露在 75% 的高氧环境下,然后返回正常空气环境中,其结果可重复性较高。另外,我们通过预实验发现暴露在 80% 或以上浓度的氧环境下,视网膜新生血管的发生率仅有轻微增加,但母鼠与幼鼠的死亡率增加明显,因此仅采用了 75% 的氧浓度。在实验中氧诱导模型组鼠比正常对照组体重低、尾短,说明幼鼠在高氧情况下出现减缓发育的趋势。

用荧光素眼底血管造影来观察鼠类这种小型动物的眼底血管改变较为困难,而用高分子量的荧光素血管灌注及视网膜铺片可以很容易地观察到视网膜血管情况。我们发现,出生后第 12 天因持续高氧使小血管闭塞,出现无灌注区;随后处于相对低氧状态,视网膜血管出现扩张、迂曲、微血管瘤,考虑是视网膜组织的代偿性反应;在预实验中发现当幼鼠返回正常空气环境 2 d 后,即出生后第 14 天开始出现新生血管,说明血管的改变已不能适应组织对氧的需求,至第 17 天新生血管反应加大,无灌注区缩小,这符合文献报道的第 17 天新生血管反应最大,随后新生血管缓慢退化,在第 24 天重新建立正常的血管结构^[1]。因此我们选择出生后第 12、14、17 天作为氧诱导模型组的观察对象。另外我们观察到氧诱导模型的视网膜血管形态特征是表层和深层血管的中心区出现无灌注,与人类的 ROP 有所不同,无灌注区出现在中央而不在周边部,周边部视网膜血管

始终充盈,也许和玻璃体血管与周边部视网膜血管保持连接,玻璃体血管的持续供给有关。

生理状态下,刺激和抑制血管生成受到多种因素的调控,两者处于动态平衡。其中主要的血管生成因素是 VEGF。缺氧是促使 VEGF 高表达的主要原因^[2]。到目前为止已发现鼠有 3 个亚型^[3],当鼠的视网膜血管发育受到严重损害时,仅有 VEGF₁₂₁ (461 bp) 表达^[4]。因此我们选择观察视网膜组织 VEGF₁₂₁ 的表达。

我们在观察正常对照组视网膜血管时发现,12 d 时视网膜血管发育不成熟,VEGF 表达较第 17 天时高;第 17 天时视网膜血管发育成熟,VEGF 表达量降低。氧诱导模型组中,相对低氧状态下即出生后第 14 天 VEGF mRNA 转录开始明显增加,第 17 天时 VEGF mRNA 转录更多。McColm 等^[5]发现实验组小鼠的体重均低于正常对照组,高氧组幼鼠的视网膜血管化推迟,VEGF 表达下降;返回正常空气环境后,出现玻璃体内新生血管。本研究结果与此近似。因此视网膜新生血管发生的病理过程分为 2 个阶段:第一阶段为高氧-血管停止阶段,即在高氧环境下,VEGF 表达降低,视网膜正常血管推迟生长,甚至停止发育;第二阶段为低氧-血管增生阶段,即相对低氧刺激 VEGF 过度表达,促使异常血管新生。

综上所述,缺氧是视网膜新生血管发生的主要原因,VEGF 的表达与眼内新生血管的发生存在着明确的时空对应关系。ROP 中新生血管是暴露在高氧之后在相对低氧环境下形成的,所以临床上一方面应避免给予早产儿吸入高浓度氧,另一方面如果吸入高浓度氧,不能突然停用氧气,避免给氧状态的不稳定转变,可能会降低 ROP 新生血管的发生。

4 参考文献

- Smith LEH, Weselowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35: 101-111.
- Simpson DA, Murphy GM, Bhaduri T, et al. Expression of the VEGF gene family during retinal vaso-obliteration and hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 262: 333-340.
- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, et al. The mouse gene for vascular endothelial growth factor: genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem*, 1996; 271: 3877-3883.
- Stalmans I, Ng YS, Rohan R, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, 2002; 109: 327-336.
- McColm JR, Geisen P, Hartnett ME. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. *Mol Vis*, 2004; 10: 512-520.

(收稿日期: 2005-07-06)

(本文编辑: 朱敏)